

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 61044353 A

(43) Date of publication of application: 04.03.86

(51) Int. Cl

G01N 33/50
G01N 21/76
G01N 33/52
G01N 33/533
// C07H 21/00
C12Q 1/68

(21) Application number: 59165362

(22) Date of filing: 07.08.84

(71) Applicant: YUKI GOSEI YAKUHIN KOGYO KK

(72) Inventor: KOBAYASHI MAKOTO SUGIMOTO NOBUTAKA

(54) **METHOD FOR FLUORESCENT MARKING OF POLYDEOXYRIBONUCLEOTIDE OR POLYRIBONUCLEOTIDE**

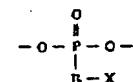
(57) Abstract:

PURPOSE: To enhance the detection sensitivity of marked polynucleotide by an optical marking method, by performing the fluorescent marking of phosphonic acid by reacting the functional group of a phosphonic acid group with an optical marking compound.

CONSTITUTION: The fluorescent marking of polynucleotide is performed by converting the phosphoric acid group of polynucleotide to a phosphonic acid bond having a functional group represented by formula (wherein R is aliphatic or aromatic hydrocarbon which may have an 1W20C branched chain and X is a functional group which may have a protective group) and reacting said functional group with a covalently bondable fluorescent marking compound. As a reaction method of phosphonic acid and the fluorescent marking compound, there are a method wherein the fluorescent marking compound is directly bonded to a phosphorus atom through a phosphorus-carbon bond and a method wherein the functional group specifically reacted with the fluorescent marking compound is bonded to a phosphorus atom so as to interpose aliphatic or aromatic hydrocarbon, which may have a branched chain,

therebetween and the fluorescent marking compound is subsequently reacted with said functional group but, from the aspect of reaction yield or reaction operation, the latter is more excellent.

COPYRIGHT: (C)1986,JPO&Japio



(式中、Rは炭素数1ないし20の分枝を有することもある脂肪族炭化水素または芳香族炭化水素を、Xは保護基を有することもある官能基を示す。)

⑫ 公開特許公報 (A) 昭61-44353

⑬ Int. Cl. 1	識別記号	厅内整理番号	⑭ 公開 昭和61年(1986)3月4日
G 01 N 33/50		P - 8305-2G	
21/76		6637-2G	
33/52		8305-2G	
33/533		7906-2G	
// C 07 H 21/00		6742-4C	
C 12 Q 1/68		8213-4B	審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 ポリデオキシリボヌクレオチドまたはポリリボヌクレオチドの蛍光
標識化方法

⑯ 特願 昭59-165362

⑯ 出願 昭59(1984)8月7日

⑰ 発明者 小林允 東京都練馬区北町8-36-6

⑰ 発明者 杉本宣敬 国分寺市東元町3-29-2

⑯ 出願人 有機合成薬品工業株式会社 東京都中央区京橋二丁目17番4号

⑯ 代理人 弁理士月村茂 外1名

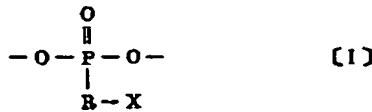
明細書

1. 発明の名称

ポリデオキシリボヌクレオチドまたはポリリボヌクレオチドの蛍光標識化方法

2. 特許請求の範囲

1. リン酸結合の少なくとも1個以上が式[1]



(式中、Bは炭素数1ないし20の分枝鎖を有することもある脂肪族炭化水素または芳香族炭化水素を、Xは保護基を有することもある官能基を示す。)

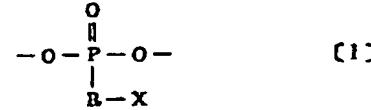
で表わされる官能基を有するホスホン酸結合であるポリデオキシリボヌクレオチドまたはポリリボヌクレオチドのホスホン酸結合の官能基に共有結合性蛍光標識化合物を反応させることを特徴とするポリデオキシリボヌクレオチドまたはポリリボヌクレオチドの蛍光標識化方法。

2. 保護基を有することもある官能基Xが、チオール基、アミノ基、水酸基、カルボキシル基、アルデヒドおよびケトンである特許請求の範囲第1項記載の蛍光標識化方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はリン酸結合の少なくとも1個以上が式[1]



(式中、Bは炭素数1ないし20の分枝鎖を有することもある脂肪族炭化水素または芳香族炭化水素を、Xは保護基を有することもある官能基を示す。)

で表わされる官能基を有するホスホン酸結合であるポリデオキシリボヌクレオチドまたはポリリボヌクレオチド(以下、ポリヌクレオチドと総称する)のホスホン酸結合の官能基に共有結合性蛍光標識化合物を反応させることからなる

ポリヌクレオチドの蛍光標識化方法に関するものであり、本発明により得られる蛍光標識化された特定の塩基配列を有するポリヌクレオチドは標的遺伝子の同定および抽出に使用され、遺伝子工学、臨床診断および食品等の分野で広く利用され得るものである。

(発明の背景)

近年遺伝子工学の研究が盛んになるに伴い、有用物質の生産に必要な遺伝子の検出に、特定の塩基配列を有するポリヌクレオチドが用いられるようになってきている。例えば臨床診断の分野においては現在免疫学的方法および生物学的方法が用いられているが、前者は検査時間は一般に数分と短いものの交差反応や干渉作用のためにしばしば不明瞭な結果を生じ、また後者は培養に長時間を要するなどの欠点を有する。これに対して、遺伝子を検出することで疾患の診断を行なうポリヌクレオチド法は検査時間は一般に数時間を要するが、検出感度ばかりではなく特異性も非常に高く、また誤差がきわめて小

き扱えない⑩健康上の問題⑪使用後の廃棄の問題⑫半減期に合せて予約購入するため実験の期日がそれにより制約されるなどの難点がある。これに対して放射性同位元素を用いない標識化法として光標識法が提案され、特開昭58-23795号公報および特開昭58-40099号公報には化学発光、生体発光、¹⁴C発光を利用して標識化する方法が開示されている。しかし光標識法としては、チミジンあるいはウリジンアナログとしてそのO-5位にアミド結合を介してピオチンを付したO-トリホスフエートを酵素的ニクトランスレーションの手法でポリヌクレオチドに組み込んで標識化し、標的遺伝子を検出する方法(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 第80巻, 第4045頁(1983年))が実用化されているのみである。

(発明が解決しようとする問題)

核酸は核酸塩基、糖、リン酸の3つの構成要素から構成され、それぞれの構成要素を光標識化することが可能であるが、そのさいポリヌク

レオチドの利点を有し、感染症のみならず免疫学的方法では検出できない潜在性ウイルスも検出可能であるため、これに適したポリヌクレオチドの開発が要望されている。

(従来の技術)

ポリヌクレオチドを用い、交雑法によつて標的遺伝子を検出するさいは、ポリヌクレオチドを標識化する必要がある。標識化は放射性同位元素を用いる方法と光標識法に大別される。現在放射性同位元素³²Pを用いる方法が最も利用されており、特開昭58-170496号公報にはATP(γ -³²P)とキナーゼでポリヌクレオチドの β -末端位に³²Pで標識したリン酸基を導入し、³²Pから放射される γ 線でフィルムを感光させ、その黒斑点によつて標的遺伝子の存在を検出する方法が開示されている。放射性同位元素による標識化は感度の点で優れている反面、使用にさいし①取り扱い上熟練が必要②法規上の規制が厳しく、特別の施設および測定機器が必要であり、またその限定された場所でしか取

れオチドが標的遺伝子とハイブリッドする性質を損うことのないよう標識化合物を導入する必要がある。しかし、核酸塩基部を光標識化する場合、ピリミジン系塩基ではO-5位に標識化合物を導入することが可能であるが、プリン系塩基については立体化学的に空いているのはO-8位とN-7位であり、O-8位に標識化合物を導入すると塩基と糖がSyn型配座をとるために一般的には二重らせんが右巻きである場合はハイブリッド能を失い、またN-7位に導入する場合は窒素が四級となり、糖と塩基部のグリコシド結合が切れる、いわゆる脱プリン反応が生じやすくなるためプリン系塩基を光標識化することは困難である。従つて核酸塩基部の光標識化はピリミジン系塩基の場合のみ有効であり、ポリヌクレオチドの塩基配列がプリン系塩基のみの場合は光標識化ができないという不適合を生じる。次に、糖部を光標識化する場合、ポリデオキシリボヌクレオチドでは両末端の水酸基しか利用できず、ポリリボヌクレオチドで

は理論的には2-位水酸基が利用可能であるが、この位置に光標識化合物の如き大きさの分子を導入するとハイブリッド形成に影響を及ぼすため、ポリデオキシリボスクレオチドと同様に両末端の水酸基しか利用できず検出感度が低下する。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは光標識法により標識化したポリスクレオチドの検出感度を向上させるため種々検討を加えた結果、核酸構成要素のリン酸基に光標識化合物を導入することにより、ポリスクレオチドの任意の位置に任意の数の光標識化合物の導入を可能とすることを見い出すと共に、リン酸基の代わりに官能基を有するホスホン酸基を選択し、このホスホン酸基の官能基と光標識化合物を反応させてホスホン酸基を光標識化することにより、リン酸基を光標識化するときに生ずる④合成法によるポリスクレオチド合成後の脱保護工程での標識化合物の脱離あるいはインターミクレオチド結合の切断④リン原子が

2つに大別されるが、反応収率や反応操作上の点からも後者の方が秀れた方法である。このさい用いる官能基としてはチオール基、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、アルデヒドおよびケトンが通常用いられるが、螢光標識化合物と特異的に反応する官能基であればこれに限定されるものではない。これらの官能基はポリスクレオチド合成のさい副反応を起こすことが考えられるので、保護基により保護することが望ましく、保護基としては最終脱保護工程でスクレオチドの塩基部や水酸基の保護基と同時に除去されるものであればよい。また、螢光標識化合物としては前述の官能基と共有結合を生ずる螢光標識化合物であればすべて使用することができ、ダンシルアジリジン、5-ヨードアセトアミドフルオレセイン、1-プロモバイマン、N-[*p*-(2-ベンズイミダゾリル)フェニル]マレイミド、N-(3-ビレン)マレイミド、フルオラミン、ダンシルクロリド、4-プロモメチル-7-メトキシクマリン、ダンシルヒド

キラリティーを有することによる得られた光標識ポリスクレオチドのリン原子の立体化学の不統一、という問題も解決し、また、光標識化合物として官能基と特異的に反応する共有結合性螢光標識化合物を用いることにより所期の目的を達成することを見い出し本発明を完成したるものである。

(ポリスクレオチドの螢光標識化)

本発明のポリスクレオチドの螢光標識化は、ポリスクレオチドのリン酸結合に代えて官能基を有するホスホン酸結合とし、この官能基と共有結合性螢光標識化合物を反応させることにより螢光標識化するものである。

ホスホン酸と螢光標識化合物との反応は、螢光標識化合物をリン-炭素結合を介して直接リン原子に結合させる方法、および螢光標識化合物と特異的に反応する官能基を分枝鎖を有することもある脂肪族炭化水素または芳香族炭化水素を間に挟んでリン原子と結合させたのち、この官能基に螢光標識化合物を反応させる方法の

ラジン、フルオレセイン-6-チオセミカルバジドなどが例示されるがこれらに限定されるものではない。

ポリスクレオチドの螢光標識化は、ポリスクレオチドの両末端を螢光標識化するだけでなく、インターミクレオチド結合部を螢光標識化することにより一層の検出感度の向上を達成できる。螢光標識化の方法としては、任意の位置にホスホン酸結合を有するポリスクレオチドを合成し、これに螢光標識化合物を反応させて標識化する方法、およびホスホン酸と螢光標識化合物を反応させて得られる螢光標識ホスホン酸基を、通常のリン酸基を用いるポリスクレオチドの合成手段と同様の方法で導入し標識化する方法、のいずれを用いてもよいが、得られる螢光標識化されたポリスクレオチドが、立体化学的に標的遺伝子とハイブリッド可能であることが必要である。

本発明において用いられるホスホン酸の合成は *Heubner Weges Methoden der Organischen*

Chemie, E. Müller, Editor, Vol. III/1.2, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. (1963~64) に記載されているが、亜リン酸シリルエステルと臭化アルキルのアーナゾフ (Arbuzov) 反応を利用する合成法 (有機合成化学協会誌, 第39巻, 第918頁 (1981年)) は副反応も少なく收率も良好である。

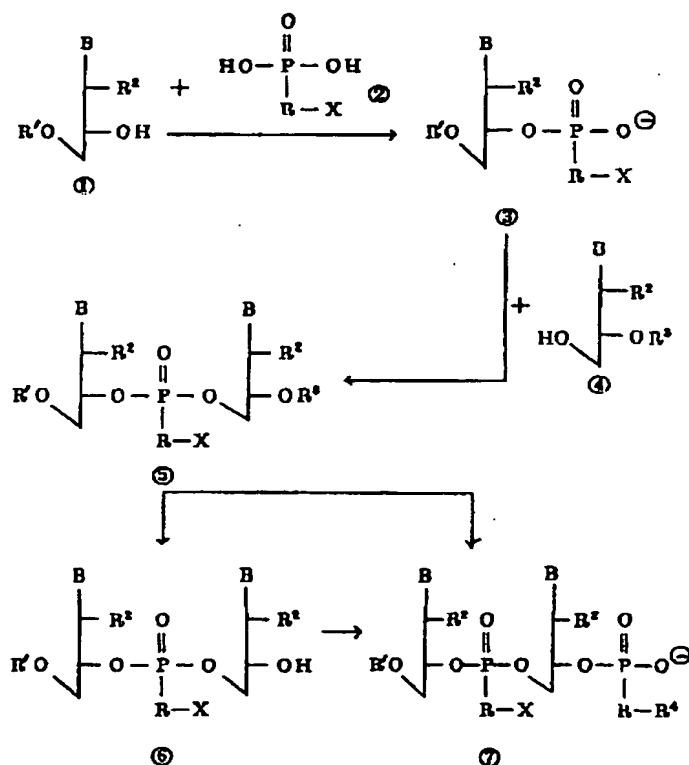
本発明におけるポリヌクレオチドは、ヌクレオシド (反応式 [1] の化合物①) と官能基を有するホスホン酸 (反応式 [1] の化合物②) を縮合剤たとえばジシクロヘキシルカルボジイミド、アルキルベンゼンスルホニルクロリド、アルキルベンゼンスルホニルアゾール、アルキルベンゼンスルホニルニトロアゾールなどの存在下に反応させることによりホスホン酸化された單量体 (反応式 [1] の化合物③) が得られる。化合物③は β -水酸基が保護されていないヌクレオシド (反応式 [1] の化合物④) と縮合剤の存在下に縮合させて二量体 (反応式 [1] の化合物⑤) とする。化合物④において R^4 は X , R^1 , R^2 の

保護基とは別異であり選択的に除去できる保護基であることが望ましいが、 R^1 の保護基と同一の条件で除去できる保護基でもよく、また場合によつては保護基を有するリン酸基でもよい。化合物で示される二量体のホスホン酸リン原子は結合している基が全て異なるためキラリティーを有するようになり、絶対表示法で R 体と S 体の 2 個のジアステレオマーの混合物となるが、この 2 個のジアステレオマーはシリカゲルクロマトグラフィーで分離し、立体化学的に單一の二量体とすることができる。化合物⑤で示される二量体の R^4 が保護基を有するリン酸基の場合は、キラリティーを有するリン原子が 2 個となり、4 個のジアステレオマーが生成し立体異性体の分離が困難となるので、 R^4 は β -末端水酸基が遊離の二量体 (反応式 [1] の化合物⑥) に誘導できる保護基、すなわち X , R^1 , R^2 の保護基と別異であり選択的に除去が可能であるか、または R^1 の保護基と同一の条件で除去できる保護基であることが望ましい。後者の場合は β ,

β -末端水酸基を遊離の形にしたのち β -末端水酸基のみを再保護することにより化合物⑥で示される二量体とする。化合物⑥は β -末端水酸基をリン酸化することにより二量体 (反応式 [1] の化合物⑦) とする。化合物⑦は R^4 が保護基を有するリン酸基である化合物⑤からも誘導でき、このさい化合物⑦の β -末端リン酸基のキラリティーが消失してジアステレオマーが 2 個となるので、シリカゲルあるいは遊離シリカゲルクロマトグラフィーにより R 体と S 体に分離できる。

(以下余白)

反応式 [1]



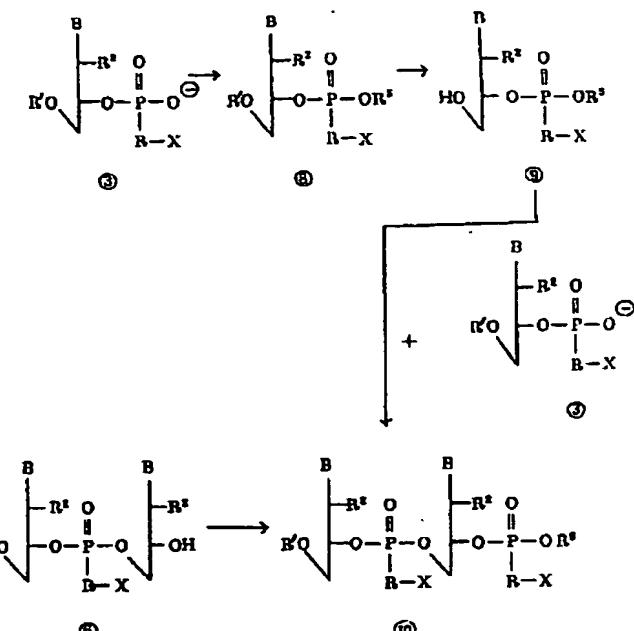
(反応式[I]において、Bは保護基を有することもある塩基残基を、R¹は水素原子またはトリチル基、モノメトキシトリチル基、ジメトキシトリチル基などの保護基を、R²は水素原子または保護基を有することもある水酸基を、R³はR¹の保護基と同時にXもしくはX、R¹、R²の保護基とは別異であり選択的に除去できる保護基または保護基を有するリン酸基を、R⁴はリン酸保護基を示し、BおよびXは前記と同一である。)

次に化合物③で示される单量体のホスホン酸をリン酸保護基R⁴で保護した单量体(反応式[I]の化合物④)としたのち、酸性条件下で化合物④のR¹の保護基を除去し、5'-水酸基が遊離である单量体(反応式[I]の化合物⑤)に導導し、次いで化合物⑥で示される单量体と化合物③で示される单量体を縮合剤の存在下に反応させて二量体(反応式[I]の化合物⑩)を得る。なお、この化合物⑩は化合物⑥で示される二量体のホスホン酸化によつても得られる。

(反応式[I]において、R⁴はR⁴と同一または異なるリン酸保護基を示し、B、X、R¹およびR²は前記と同一である。)

DNAおよびRNAはそれぞれ4種類のヌクレオシドからなり、化合物④、化合物⑤または化合物⑩で示される16種類の二量体を予め調製しておくことにより、いかなる塩基配列のポリヌクレオチドの合成も可能である。これらの二量体は固相あるいは液相法(Nucleic Acids Research, 第11巻, 第5189頁および第6225頁(1983年)、Biochemistry, 第20巻, 第1874頁(1981年))で希望する塩基配列のポリヌクレオチドの合成に用いられ、また化合物⑥は変型ホスフアイト法(Tetrahedron Letters, 第24巻, 第1019頁(1983年))を利用してことによつて3'-末端水酸基が遊離のままでポリヌクレオチドの合成に用いることができる。ポリヌクレオチド中に含まれるホスホン酸結合の個数は、ポリヌクレオチドの鎖長、検出感度、ハイブリッド条件等に合わせて自由

反応式[I]



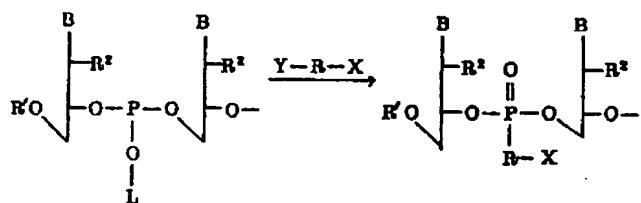
に選択することができる。化合物④で示される单量体または化合物⑩で示される二量体を原料として用いた場合は、立体化学の統一をはかることは困難であるが、全てのリン酸結合をホスホン酸結合に代えたポリヌクレオチドを得ることができる。しかし精製の容易さを考慮すると化合物⑩を使うほうが好ましい。標的遺伝子とのハイブリッド形成に影響を及ぼさない限りリン原子のキラリティーは統一されなくともよいが、立体化学的に統一されたポリヌクレオチドの合成はル体とS体に分離した化合物④あるいは化合物⑥で示される二量体のいずれか一方のジアステレオマーを原料として用いることにより達成できる。二量体-二量体間のリン酸結合は完全脱保護後ジエステルとなりそのキラリティーが消失するのでこの問題は解消される。この場合ホスホン酸結合は最大限1個置きに導入されることになる[Journal of Biological Chemistry, 第255巻, 第9659頁(1980年)、Biochemistry, 第21巻, 第2507頁

(1982年)】。

また、反応式[I]および反応式[II]で示された二量体あるいはポリヌクレオチドは、反応式[III]-[IV]の如きホスファイト中間体からのアーナーソフ反応を経る方法、あるいは反応式[V]-[VI]の如きアルキルジクロロホスホンをホスホン酸化剤としてホスファイト法の手法を利用する方法でも合成可能であるが、前者はアーナーソフ反応のさい分解する可能性があるので、後者の方が望ましい。

反应式[1]

(1)

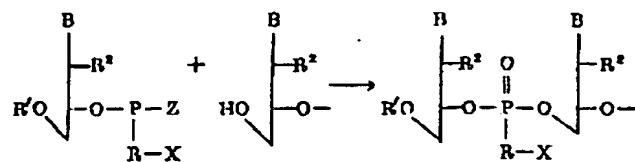


なお、本発明におけるポリヌクレオチドとは、少なくとも1個のホスホン酸結合を有する2個以上の単體より成り、ポリヌクレオチドの鎖長やその塩基配列は限定されることなく、目的に応じて自由に選択できる。

实施例1

臭化 2 - N - ベンゾイルエチルとトリス(トリメチルシリル)ホスファイトのアーナゾフ反応により得られる 2 - N - ベンゾイルエチルホスホン酸ビリジン塩 4.0 mmol および 0 -ジメトキシトリチルチミジン 2.0 mmol を、ダウエックスビリジニウムレジン 0.5 g とジシクロヘキシルカルボジイミド 2.00 mmol の存在下に、100 mL のビリジン中で 37°C 3 日間反応させた後、シアノエタノール 100 mL を加え、さらに 2 日間反応する。反応終了後、含水ビリジン 200 mL を加え、ジシクロヘキシルウレアを粗別し、粗液を濃縮する。残渣を 250 mL のクロロホルムに溶解し、シリカゲルクロマト(溶出液: メタノール - クロロホルム) で精製

११



(反応式 [II]において、Lは脱離基を、Yはヘロゲン原子を、Zはヘロゲン原子、二級アミンまたはアゾール類を示し、B、X、R¹およびR²は前記と同一である。)

上記の方法により得られたホスホン酸結合を含有し特定の塩基配列を有するポリヌクレオチドの全ての保護基を通常の脱保護基操作により除去し精製したのち、標的遺伝子とのハイブリッド形成の前あるいは後に、ポリヌクレオチド中のホスホン酸結合の官能基と特異的に反応する共有結合性蛍光標識化合物を反応させて蛍光標識化する。この反応はきわめて容易に進行し、ポリヌクレオチドと蛍光標識化合物を混合することで瞬時に終了し蛍光標識化は完了する。

したのち、ヘキサン中に洒下して粉末化する。次いでアセトニトリル中でトリエチルアミンで処理してシアノエチル基を除去し、5'-O-ジメトキシトリチルチミジル-3'-O-(2-N-ペニソイルエチル)ホスホネートトリエチルアンモニウム塩を得る。

次に、コハク酸を介してチミジンを担持（100 nmol 以下／g・樹脂）したポリスチレン樹脂（1当クロスリンクド）100 mgを用い、5'-O-ジメトキシトリチルチミジン-3'-O-（2-N-ベンゾイルエチル）ホスホネートトリエチルアンモニウム塩を、[Nucleic Acids Research, 第11巻, 第6225頁 (1983年)]に記載された方法に従い順次に9回結合させて10量体を合成した。ポリスチレン樹脂を10 mlのエチレンジアミン：エタノール（1:1）と10時間振とう後、離別し、雄液を濃縮して逆相（O₁₈）シリカゲルクロマト（水-アセトニトリル直線濃度勾配）で精製し、80%酢酸で処理して5'-末端の保護基を

除去したのち、一部を再び逆相(O_{10})シリカゲルクロマトで精製し、アミノエチルホスホン酸結合をもつ10量体100D(260nm)を得た。

次に、10量体100Dを0.5Mホウ酸ナトリウム緩衝液(pH 8.5)3.6mlおよびアセトニトリル1.0mlに溶解し、激しく振とうしながら0.4mlのフロレサミンアセトン溶液(20mg/100ml)を加え、数秒間振とうを続けたのち約1分間放置後、390nmの光で励起し、475nmの蛍光を測定した。

特許出願人 有機合成薬品工業株式会社
代理人 弁理士 月村  外1名

手続相正書

昭和59年10月31日

特許庁長官 志賀 学 廉 

1. 事件の表示

昭和59年特許願第165362号

2. 発明の名称

ポリデオキシリボヌクレオチドまたは
ポリリボヌクレオチドの蛍光標識化方法

3. 税正をする者

事件との關係 特許出願人

東京都中央区京橋二丁目17番4号

有機合成薬品工業株式会社

代表者 玉重 雄雄

4. 代理人

東京都千代田区麹町4丁目5番地(〒102)

(6513)弁理士 月村  外1名

電話 東京(260)551-3

5. 税正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の箇



6. 税正の内容

- (1) 明細書第10頁20行目の「Wegls」を「Weyls」と補正する。
- (2) 同書第11頁1行目の「Edilor」を「Editor」と補正する。
- (3) 同書第11頁2行目の「Verion」を「Verloc」と補正する。
- (4) 同書第23頁3行目および5行目の「100D」を「10 OD」と補正する。

以上